

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO AGRONOMIA, ANIMALI, ALIMENTI RISORSE
NATURALI E AMBIENTI

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Viticole ed
Enologiche

USO DI LACHANCEA THERMOTOLERANS IN SEQUENZA CON
SACCHAROMYCES CEREVISIAE SU MOSTI ROSSI

Relatore
Prof. Simone Vincenzi

Laureanda/o
Antonino
Palermo
Matricola n.
2007508

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

ABSTRACT	1
CAPITOLO 1: INTRODUZIONE	3
1.1 LACHANCEA THERMOTOLERANS	3
1.2 SACCHAROMYCES CEREVISIAE	4
CAPITOLO 2: COMPONENTI DEL VINO	6
2.1 ACIDI ORGANICI	6
2.2 ACIDITÀ TOTALE	7
2.3 pH	8
2.4 ALTRI COMPONENTI	9
2.4.1 GLICEROLO	9
2.4.2 SOLFITI	9
2.4.3 RIBOFLAVINA	10
CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI	12
3.1 LIEVITI	12
3.2 PRODOTTI ENOLOGICI	13
3.3 RECIPIENTI	14
3.4 MOSTO	14
3.5 PROTOCOLLO DI VINIFICAZIONE	15
CAPITOLO 4: RISULTATI	17
4.1 DENSITÀ E TITOLO ALCOLOMETRICO	17
4.2 TEMPERATURA	19
4.3 ACIDO LATTICO, ACIDO MALICO	20
4.4 pH	22
4.5 COMPOSTI VOLATILI	23
4.6 RIBOFLAVINA	26
CAPITOLO 5: CONCLUSIONI	28
BIBLIOGRAFIA	29
RINGRAZIAMENTI	

ABSTRACT

Il cambiamento climatico, nonostante sia oggetto di studio da parte di scienziati già fin dalla fine del 1900, è purtroppo oggi un tema di grande attualità poiché la popolazione mondiale ne sta sperimentando gli effetti. Tale fenomeno si manifesta con l'innalzamento delle temperature, lo scioglimento dei ghiacciai, la scarsità d'acqua e gli eventi atmosferici catastrofici alternati a lunghi periodi di siccità; tutti questi fattori provocano l'alterazione dell'ambiente in cui viviamo e la conseguente riduzione della biodiversità. L'agricoltura, compresa la viticoltura, risente degli effetti del cambiamento climatico, infatti, le uve, con il continuo aumento delle temperature (circa + 1.15°C dal 1991) e le scarse piogge, risultano avere una ridotta acidità e un elevato contenuto zuccherino, i quali comportano un aumento del titolo alcolometrico e una riduzione della stabilità microbiologica.

Oltre alle soluzioni di tipo tecnologico, spesso molto invasive, una possibile soluzione è l'utilizzo di lieviti non – *Saccharomyces* come, ad esempio, *Lachancea thermotolerans* che consuma gli zuccheri fermentescibili trasformandoli in acido lattico, aumentando in questo modo l'acidità totale e abbassando il titolo alcolometrico. In questo studio sono stati inoculati due ceppi di lievito *Lachancea thermotolerans* in sequenza con *Saccharomyces cerevisiae*, a 24 e 48 ore, per completare la fermentazione alcolica.

Il contenuto di acido lattico, generalmente non presente nei vini ottenuti con l'inoculo di soli ceppi *Saccharomyces cerevisiae*, rilevato dalle analisi effettuate, ha confermato il potere acidificante di *Lachancea thermotolerans*.

ABSTRACT

Climate change, although it has been studied by scientists since the late 1900s, is unfortunately a hot topic today as the world's population is experiencing its effects. This phenomenon consists in rising temperatures, melting glaciers, water scarcity and catastrophic weather events alternating with long periods of drought; all of these factors cause the alteration of the environment in which we live and the consequent reduction in biodiversity. Agriculture, including viticulture, suffers from the effects of climate change, in fact, grapes, with the continuous increase in temperatures (about + 1.15°C since 1991) and low rainfall, are found to have reduced acidity and high sugar content, which lead to an increase in alcoholic strength and a reduction in microbiological stability. In addition to technological solutions, which are often very invasive, one possible solution is the use of non-*Saccharomyces* yeasts such as, for example, *Lachancea thermotolerans*, which consumes fermentable sugars by converting them into lactic acid, thereby increasing total acidity and lowering alcoholic strength. In this study, two strains of *Lachancea thermotolerans* yeast were inoculated sequentially with *Saccharomyces cerevisiae* at 24 and 48 hours to complete alcoholic fermentation. The lactic acid content, which is generally not present in wines made by inoculating only *Saccharomyces cerevisiae* strains, detected by the analyses performed, confirmed the acidifying power of *Lachancea thermotolerans*.

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

1.1 *LACHANCEA THERMOTOLERANS*

Lachancea thermotolerans, precedentemente noto come *Kluyveromyces thermotolerans*, è una specie di lievito del genere *Lachancea* (1). La peculiarità di *L. thermotolerans* è la capacità di produrre acido lattico durante la fermentazione alcolica, arrivando a concentrazioni massime di 16,6 g/L (2). La produzione di acido lattico, infatti, non è un metabolismo comune tra i lieviti (3), basti pensare che *Saccharomyces cerevisiae*, in condizione normali, durante la fermentazione alcolica ne produce solamente 0,2-0,4 g/L (4). Nonostante le alte rese di acido lattico ottenute, *L. thermotolerans* rimane comunque poco efficiente per una produzione chimica industriale di questa molecola, mentre è considerato, interessante per i processi di vinificazione.

In effetti, l'uso di *L. thermotolerans* per condurre parzialmente la fermentazione è sempre più ricercato, si ritiene infatti, che la sua capacità di acidificazione biologica influenzi positivamente le qualità organolettiche, donando al vino aromi floreali e di frutta tropicale (fattore che dipende dal tempo di fermentazione prima dell'inoculo di *Saccharomyces cerevisiae*). Inoltre, l'acido lattico, al contrario di altri acidi dell'uva come l'acido malico e il citrico, non viene degradato né metabolizzato dai microrganismi, per cui la sua presenza rende i vini più stabili (5).

Un'altra proprietà interessante di *L. thermotolerans* durante la fermentazione, è la produzione di glicerolo, questo si osserva sia durante la fermentazione spontanea sia con l'inoculo sequenziale tra *L. thermotolerans* e *Saccharomyces cerevisiae*. Il vantaggio dell'inoculo sequenziale è che la stessa quantità di glicerolo viene prodotta con una concomitante produzione di acido acetico inferiore (6).

L. thermotolerans è in grado di fermentare glucosio e saccarosio con un potere fermentativo moderato (7), ha una scarsa resistenza all'etanolo e riesce a

sopravvivere per diversi giorni in presenza del 9% di alcool (8), questo spiega il perché del suo declino e della sua morte man mano che la fermentazione avanza (9).

Sono stati isolati 5 ceppi in grado di resistere fino a 10 mg/L di SO₂ libera (6), ma è possibile trovare ceppi resistenti a più di 100 mg/L di SO₂ totale (10), la scarsa resistenza potrebbe essere correlata proprio alla limitata produzione di acetaldeide e di acido piruvico (11).

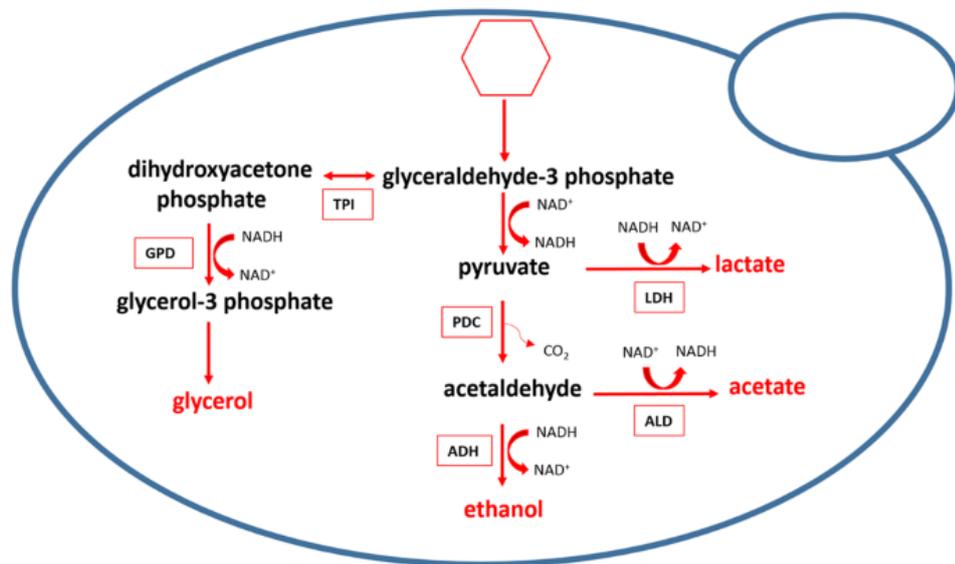


Figura 1: Metabolismo di *Lachancea thermotolerans*. (12)

1.2 *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Da almeno 5000 anni *Saccharomyces cerevisiae* è il principale lievito utilizzato nella produzione di cibi e bevande alcoliche. Da sempre è stato oggetto di studio data la sua semplicità di utilizzo e di propagazione. Ha un tempo di generazione molto breve, fasi sessuate e asessuate nel suo ciclo di vita e può essere geneticamente modificato con facilità (13).

Il *Saccharomyces cerevisiae* è una specie di lievito che ha un'ottima resistenza all'etanolo, molti ceppi analizzati riescono a crescere in presenza del 13,5 % di

alcol, ma alcuni ceppi, come UCLM S377, presentano una crescita anche in presenza del 15% di etanolo (14).

Il lievito *Saccharomyces* ha un'ottima capacità fermentativa, è dotato infatti di 19 HXT (hexose transporter) in grado di trasportare gli esosi di cui necessita (glucosio e fruttosio). Il glucosio una volta all'interno della cellula entra nel ciclo della glicolisi, la quale lo trasforma in 2 molecole di piruvato riducendo 2 molecole di Nicotinammide adenina dinucleotide (NADH). Tale coenzima (forma ridotta di NAD^+) è un trasportatore di elettroni, presente nella cellula in quantità limitata, di conseguenza deve essere riossidato per permettere la ciclicità della glicolisi, per questo il lievito attua la fermentazione alcolica.

La fermentazione alcolica, infatti, va prima a decarbossilare il piruvato ad acetaldeide, liberando CO_2 , e successivamente a ridurre l'acetaldeide ad etanolo mediante l'enzima alcol deidrogenasi, riossidando così il NADH.

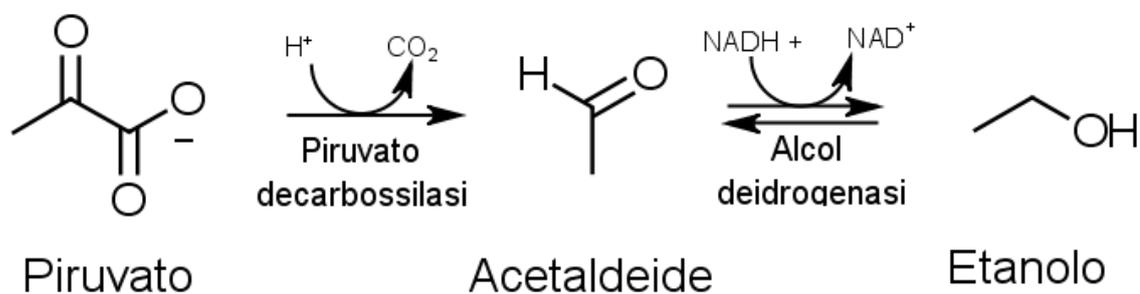


Figura 2: Fermentazione alcolica (Crisafulli 2020)

Il lievito *Saccharomyces cerevisiae* è un organismo aerobio facoltativo, in grado di portare avanti due processi per la produzione di energia, la fermentazione alcolica e la respirazione. Nonostante la respirazione possa produrre una quantità di energia superiore, il lievito presente in un mosto con una quantità considerevole di glucosio va ad attuare la fermentazione alcolica, questo perché il glucosio fa scattare l'effetto Crabtree inibendo così lo sviluppo mitocondriale e potenziando la glicolisi. In questo modo il lievito vince la competizione contro gli altri microrganismi.

CAPITOLO 2: COMPONENTI DEL VINO

2.1 ACIDI ORGANICI

Gli acidi organici, grazie alle loro proprietà di conservanti, contribuiscono in modo determinante alla composizione, alle qualità sensoriali ma soprattutto alla stabilità microbiologica (15). In genere i vini con una elevata acidità possiedono un alto potenziale di invecchiamento, i vini rossi in particolare possono avere acidità più basse, in quanto i composti fenolici presenti accentuano il gusto acido e contribuiscono alla loro longevità (16).

L'acido organico più presente nel vino è l'acido tartarico.

L'acido L(+)-tartarico è un acido forte presente naturalmente nell'uva; grazie al suo potere acidificante conferisce al vino un pH compreso tra 3,0 e 3,5. Principalmente prodotto durante la fase erbacea dello sviluppo dell'uva è l'acido più presente nel vino e contribuisce a dargli struttura, sapore e aroma.

Un altro acido organico è l'acido malico, un acido presente naturalmente nell'uva; raggiunge la concentrazione massima durante la fase erbacea come l'acido tartarico ma a differenza di quest'ultimo viene metabolizzato nel processo di respirazione nelle settimane successive all'invasatura. Nell'uva si trova nella forma isomerizzata L(-)-Malico a concentrazioni medie di 4-6 g/L nelle regioni settentrionali e tra 1-2 g/L nelle regioni meridionali (16).

L'acido lattico invece, non è naturalmente presente nell'uva. Può essere prodotto dai lieviti durante la fermentazione degli zuccheri nella forma isomerizzata D(-)-lattico, oppure dai batteri nella forma L(+)-lattico durante la fermentazione malolattica.

I batteri lattici, come *Oenococcus oeni*, utilizzando come substrato l'acido malico presente nel vino, sono i principali produttori di acido lattico

L'acido lattico a differenza del malico dona al vino una maggiore morbidezza e un sapore acidulo, qualità ricercata nei vini rossi (aroma lattico).

L'acido acetico è uno dei più semplici acidi carbossilici presenti nel vino, partecipa alla produzione degli acidi grassi e la sua concentrazione si attesta tra 0,2 e 0,3 g/L (16). Sopra questa soglia diventa percettibile con il suo caratteristico odore pungente. È prodotto principalmente dall'attività dei batteri ma deriva anche da quella dei lieviti. La sua concentrazione aumenta in maniera significativa solo quando è in atto un attacco da parte dei batteri acetici del vino, i quali producono acido acetico a partire dagli zuccheri oppure dall'etanolo.

L'acido citrico è un acido molto diffuso in natura, nei mosti e nei vini ha un tenore compreso tra 0,5 e 1 g/L (16). La sua concentrazione e le aggiunte devono essere sempre tenute sotto controllo perché l'acido citrico può essere attaccato dai batteri lattici che producono acido acetico mediante la citrato-liasi (17). Questo acido apporta al vino una sensazione di freschezza e contribuisce anche al suo equilibrio gustativo.

2.2 ACIDITÀ TOTALE

L'acidità totale, chiamata anche acidità titolabile, viene espressa in meq/l o in g/L di acido solforico (FRANCIA) o di acido tartarico (ITALIA). Un valore basso di acidità conferisce morbidezza e struttura al vino, un valore elevato lo rende aspro e pungente mentre una giusta misura aiuta a vivacizzare e preservare il colore, garantendone anche una lunga conservazione.

L'acidità totale esprime tutte le specie acide presenti, dagli acidi minerali agli acidi organici. Il contributo di ogni acido dipende dalla sua classe di appartenenza e dal suo stato di dissociazione (16).

2.3 pH

Il pH è un parametro per valutare la concentrazione di ioni di idrogeno in un mezzo mediante una scala da 0 a 14. Un liquido è acido se il pH è compreso tra 0 e 7, neutro se ha un valore pari a 7 e alcalino se ha un valore compreso tra 7 e 14. Non è correlato alla quantità degli acidi presenti ma alla loro capacità di dissociazione.

Nel vino il pH oscilla tra 2,8 e 4, generalmente i produttori preferiscono mantenerlo tra 3,3 e 3,8 utilizzando correttori di acidità. I prodotti che possono essere utilizzati per l'acidificazione sono acido tartarico, malico e lattico, autorizzati nell'allegato VIII Parte I Punto C del Reg. (UE) 1308/2013, ma possono essere utilizzati anche agenti biologici in grado di abbassare il pH senza l'aggiunta di prodotti chimici.

Un pH acido si oppone allo sviluppo di microrganismi conferendo al vino una migliore stabilità microbiologica.

Anche il colore degli antociani dipende dal valore del pH, all'aumentare di quest'ultimo gli antociani si decolorano. La massima decolorazione si ha con un valore di pH compreso tra 3,2 e 3,5.

2.4 ALTRI COMPONENTI

2.4.1 GLICEROLO

Il glicerolo è uno dei componenti carboniosi più abbondanti nel vino. È prodotto durante la fermentazione glicero-piruvica per rispondere alla pressione osmotica data dagli zuccheri e per riossidare il NADH, accumulato in assenza dell'enzima alcol-deidrogenasi della fermentazione alcolica. La sua concentrazione, influenzata dal ceppo di lievito, dalla temperatura e dal pH (18), oscilla tra 3 e 15g/L (16). Conferisce al vino sensazioni di grasso e morbidezza che si avvertono nella degustazione dei vini, anche se occorrono quantità superiori a quelle riscontrate naturalmente nei vini per modificarne il sapore in maniera significativa (16).

2.4.2 SOLFITI

Con il termine solfiti, si intende l'anidride solforosa (SO₂), una molecola costituita da zolfo e ossigeno, spesso aggiunta al vino sottoforma di metabisolfito di potassio. Grazie al suo potere antiossidante, antisettico e antiossidasico vengono preservate le caratteristiche organolettiche del vino e la sua qualità nel tempo.

L'abilità di produrre solfiti, durante la fermentazione alcolica, è una caratteristica genetica di ogni ceppo di lievito, sebbene la produzione sia influenzata anche dalla composizione del mosto, per questo è difficile affermare una totale assenza di solfiti nel vino.

I *Saccharomyces* hanno un'elevata tolleranza ai solfiti, questo grazie ai loro meccanismi di resistenza, tra cui la via dell'assimilazione del solfato, con la quale lo ione bisolfito viene trasformato in ione solfuro, utilizzato in seguito per la produzione di amminoacidi solforati; la pompa SSU1P (19), proteina che permette all'SO₂ di attraversare la membrana citoplasmatica e, infine, la produzione di acetaldeide, la quale si lega alla SO₂ (20) riducendo così lo stress nei confronti della cellula.

I solfiti sono dei composti tossici per l'uomo perché hanno un effetto altamente ossidante. La dose giornaliera accettabile (DGA) è stata calcolata dalla World Health Organization in 0,7 mg/Kg al giorno, dose che viene abbondantemente superata se nei vini si giunge alla dose massima legale (160 mg/L per i vini rossi, 200 mg/L per i vini bianchi). È bene quindi utilizzare la dose più bassa possibile che corrisponde a 50 mg/L anche se, secondo recenti studi la dose sufficiente di SO₂ libera per proteggere il vino da ossidazione e dallo sviluppo di microrganismi è di 20-40mg/L (21).

2.4.3 RIBOFLAVINA

La riboflavina (o vitamina B2) è la molecola colpevole del “gusto di luce” nel vino, un'alterazione aromatica che si evidenzia a seguito di una errata conservazione delle bottiglie di vino esposte a sorgenti luminose. La riboflavina, infatti, presenta picchi di assorbimento compresi tra 220 - 446 nm (22), le onde luminose comprese in questo spettro non essendo totalmente assorbite dal vetro, vanno ad eccitare la vitamina che diventa instabile. Il suo eccesso energetico investe altre molecole con la quale presenta una particolare affinità. Un esempio è la metionina, che reagendo con la riboflavina ossidata forma il metionale che si scinde poi naturalmente in metantiolo, responsabile di sentori di cavolo e uovo marcio, ed acroleina. Due molecole di metantiolo condensando danno origine al dimetildisolfuro responsabile dei sentori di cavolo cotto e cipolla.

La concentrazione della riboflavina mediamente è tra 50-70µg/L nell'uva, nel mosto invece la concentrazione sale a 110-250 µg/L durante la fermentazione, fino ad arrivare a 160 – 318 µg/L per i vini che rimangono a contatto con i lieviti (23). Questo spiega perché il problema del gusto di luce sia maggiormente sentito negli spumanti ottenuti con il metodo classico.

Per cercare di rimanere al di sotto di questa soglia è possibile adottare alcune precauzioni, come ad esempio la scelta di un lievito basso produttore e delle chiarifiche mirate. Si è notata anche una diminuzione di riboflavina successivamente ad una aggiunta di solfiti (24).

CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI

3.1 LIEVITI

In questa ricerca sono stati utilizzati due diversi ceppi di lievito entrambi colture pure di *Lachancea thermotolerans* isolati da un ambiente naturale: il primo è “Nevea” prodotto selezionato dall’azienda “Oenofrance”, il secondo invece è prodotto da un’azienda concorrente, il cui nome non può essere rivelato per riservatezza. In questa ricerca i due ceppi verranno, per comodità, nominati “lievito 1” e “lievito 2”.

Entrambi sono stati reidratati secondo le seguenti indicazioni del produttore.

Il “lievito 1” è stato reidratato in un volume pari a 10 volte il suo peso in acqua ad una temperatura tra 20 – 30°C; è stato lasciato riposare per 15 minuti e successivamente raddoppiato con mosto per l’acclimatazione rispettando una differenza di temperatura inferiore a 10°C.

Il “lievito 2” è stato reidratato in 10 volte il suo peso in acqua ad una temperatura di 37°C (temperatura controllata mediante un termometro con sonda oppure con un mostimetro con termometro integrato) in seguito è stato omogeneizzato e lasciato riposare per 20 minuti. Passati i 20 minuti il volume è stato raddoppiato con mosto per l’acclimatazione, in modo da evitare un eventuale shock termico dato da un ΔT maggiore di 10° C.

Una volta reidratati, senza superare il tempo complessivo di 45 minuti, sono stati inoculati in vasca ad una concentrazione di 20 g/hL

Il lievito *Saccharomyces cerevisiae* inoculato in sequenza invece è stato VIALATTE FERME R 26, reidratato in 10 volte il suo peso in acqua ad una temperatura compresa tra 35 e 40 °C. Lasciato riposare per circa 20 minuti il

volume è stato successivamente duplicato con mosto. Dopo ulteriori 10 minuti è stato incorporato al mosto verificando che ΔT fosse inferiore a 10 °C.

3.2 PRODOTTI ENOLOGICI

- Nutricell Initial: nutrimento organico ricco di amminoacidi, minerali e tiamina per una moltiplicazione ottimale dei lieviti. Migliora la loro performance e le qualità organolettiche del vino limitando la produzione di composti negativi come l'acidità volatile e H₂S. La dose consigliata è di 20-40 g/hl secondo il fabbisogno nutrizionale dei lieviti e il tenore di azoto assimilabile del mosto e va disciolto in 10 volte il suo peso con acqua o mosto.
- Nutricell Finish: nutrimento organico complesso. Contiene scorze di lievito che, grazie al loro effetto detossificante, migliorano la fine della fermentazione in caso di stress. L'autolisi, inoltre, libera vitamine ed altri elementi che sono necessari al metabolismo del lievito. La dose consigliata è di 20-40 g/hl, secondo il fabbisogno nutrizionale; va disciolto in 10 volte il suo peso in acqua o mosto.
- Baktol 100: soluzione di bisolfito di potassio ad una concentrazione di 100 g/L di SO₂. Ha proprietà antisettiche e antiossidanti.
- Antartika VR: è un preparato a base di un polisaccaride vegetale efficace per la stabilizzazione dei vini contro le precipitazioni tartariche di bitartrato di potassio. Efficace anche per la stabilizzazione del colore dei vini rossi. Dose consigliata 5 – 20 cl/hl
- Reflex Malo 360: batteri *Oenococcus oeni* selezionati per condurre la fermentazione malolattica dei vini rossi e bianchi in caso di condizioni limitanti come pH bassi, tenore alcolico elevato. I batteri vanno disciolti

in 20 volte il loro peso in acqua a 20°C non contenente cloro in quanto può interferire con la loro sopravvivenza. Successivamente si lasciano riposare per 15 minuti e incorporati con la massa.

3.3 RECIPIENTI

I recipienti utilizzati erano dei “*Chapeau flottant*” chiamati anche “sempre pieni” in acciaio inox della capacità di 50L, dotato di un galleggiante ad aria, munito di una pompa in acciaio inox con manometro analogico con il quale veniva verificata la pressione della camera d’aria. Prima dell’utilizzo sono stati igienizzati con soda caustica al 30% e acqua calda.

3.4 MOSTO

I mosti sono stati ottenuti dalla cooperativa “Les Vignerons Montagnac Domitienne” che acquista uva dai propri soci che spaziano per tutto il territorio della Languedoc.

Per questa ricerca sono stati selezionati, su scelta dell’enologo della società “SOFRALAB”, Olivier Fonade, 250L di mosto fiore di Merlot termovinificato. La termovinificazione è un trattamento dal quale si ottengono i vini detti “rossissimi” e consiste nel mantenere le uve appena pigiate e diraspate per 10-30 minuti ad una temperatura di 50 – 70 °C, successivamente il pigiato viene pressato e raffreddato ad una temperatura di 20°C.

Utilizzare un mosto termovinificato permette di avere una microflora ridotta in modo da limitare la competizione data da quest’ultima nei confronti di *Lachancea thermotolerans*.

Il mosto è stato trasportato in un cisterna IBC alla “Cave Espérimentale” appartenente al gruppo “SOFRALAB”. Al suo arrivo in cantina è stato prelevato un campione con il quale sono state fatte le prime analisi. La temperatura registrata era di 16°C e la densità 15/15 di 1096 (19,35 Babo), successivamente è stato equamente travasato in 5 vasche da 50L numerate da

2022-25-1 a 2022-25-5; per comodità sarà indicata solo la modalità escludendo l'anno.

Date	Cuve	Sucres Red (g/L)	TAV potential	A. Totale (g/L) H ₂ SO ₄	A. Volatile (g/L) H ₂ SO ₄	pH	SO ₂ L (mg/L)	SO ₂ Total (mg/L)	A. Malique IRTF (g/L)
21/09/2022	IBC	225	13,26	3,22	0,00	3,74	4	5	1,03

Figura 3: Analisi effettuata al mosto in entrata in cantina

3.5 PROTOCOLLO DI VINIFICAZIONE

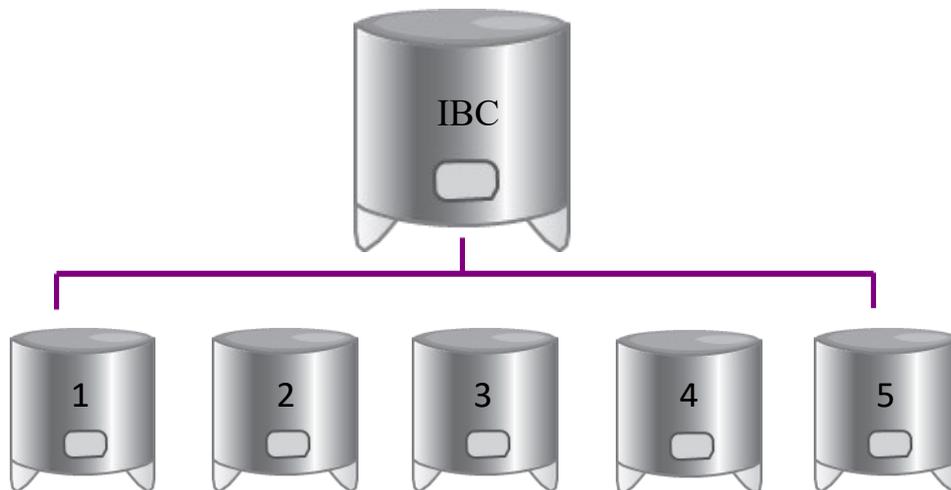


Figura 4: Suddivisione mosto in 5 vasche più piccole, una per modalità

Dopo aver distribuito il mosto nelle vasche è stato seguito il protocollo di vinificazione così applicato.

Vasca 1: LIEVITO 1 25g/hl + 24H Vialatte Ferm R26 20g/hL + Nutricell Initial 20g/hL

Vasca 2: LIEVITO 1 25g/hl + 48H Vialatte Ferm R26 20g/hL + Nutricell Initial 20g/hL

Vasca 3: LIEVITO 2 25g/hl + 24H Vialatte Ferm R26 20g/hL + Nutricell Initial 20g/hL

Vasca 4: LIEVITO 2 25g/hl + 48H Vialatte Ferm R26 20g/hL + Nutricell Initial 20g/hL

Vasca 5 (TESTIMONE): Vialatte Ferm R26 20g/hL + Nutricell Initial 20g/hL

FATTORI MODULARI PREDEFINITI

- Si richiede una temperatura del mosto al momento dell'inoculo dei lieviti non – *Saccharomyces* di: 12 - 14 °C
- Temperatura di inizio fermentazione di 14°C, fine fermentazione 20°C
- Inoculare Vialatte Ferm R26, 24 e 48 ore dopo l'inoculazione del “lievito 1” e “lievito 2”
- Solfitazione iniziale a 15 mg/L di SO₂ libera massima; non solfitare se l'uva è sana
- Protocollo analisi in fermentazione: TAV acquisita, TAV totale, zuccheri riducenti, pH, acidità totale, acidità volatile, acido lattico
- Protocollo analisi fermentazione completata: TAV acquisita, zuccheri riducenti, glucosio-fruttosio, pH, acidità totale, acidità volatile, SO₂ libera, SO₂ totale, SO₂ attiva, acido malico e acido lattico.

CAPITOLO 4: RISULTATI

In seguito, all'inoculo dei nutrienti e dei lieviti è stato effettuato regolarmente il monitoraggio del mosto, nei suoi parametri principali (densità, temperatura, titolo alcolometrico, pH, acidità totale, acidità volatile, zuccheri riducenti, SO₂ libera e totale, riboflavina e acido malico e lattico).

4.1 DENSITÀ E TITOLO ALCOLOMETRICO

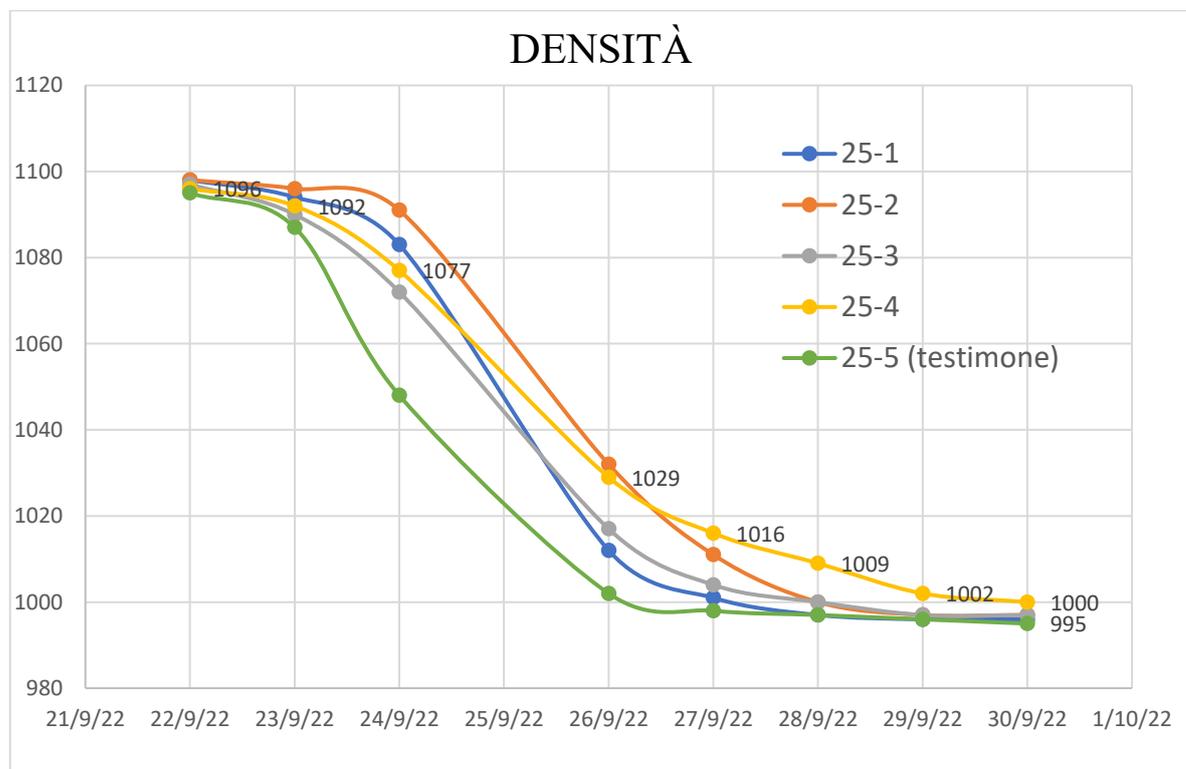


Figura 5: Variazione densità per ogni modalità

Dalle curve di densità possiamo notare come le modalità 25-1, 25-2, 25-3, abbiano svolto la fermentazione in modo molto simile, differisce invece la modalità 25-4 in cui la velocità di fermentazione è diminuita a fine fermentazione e gli zuccheri non sono stati completamente fermentati (zuccheri residui 1,7 g/L). Nella modalità 25-5 (testimone), gli zuccheri sono stati consumati completamente il 5° giorno, a differenza delle altre modalità in cui gli zuccheri sono stati consumati tra il 6/7 giorno. Nella modalità 25-5 il lievito

ha avuto un rapido adattamento e una velocità superiore nel consumo degli zuccheri, imputabile al maggiore potere fermentativo del lievito *Saccharomyces cerevisiae* e all'assenza di adattamento di ulteriori lieviti inoculati, presenti invece nelle altre modalità.

Lo si nota anche nel grafico sottostante del titolo alcolometrico come l'adattamento del lievito *Saccharomyces cerevisiae* sia stato più rapido rispetto al lievito *Lachancea thermotolerans*.

Lachancea thermotolerans, come già anticipato nell'introduzione, produce acido lattico fermentando gli zuccheri, di conseguenza la produzione di etanolo è ridotta, questo è evidenziato nella modalità 25-4 nella quale si presenta la concentrazione di acido lattico più alta (10.6g/L) e un titolo alcolometrico inferiore (12.91g/L)

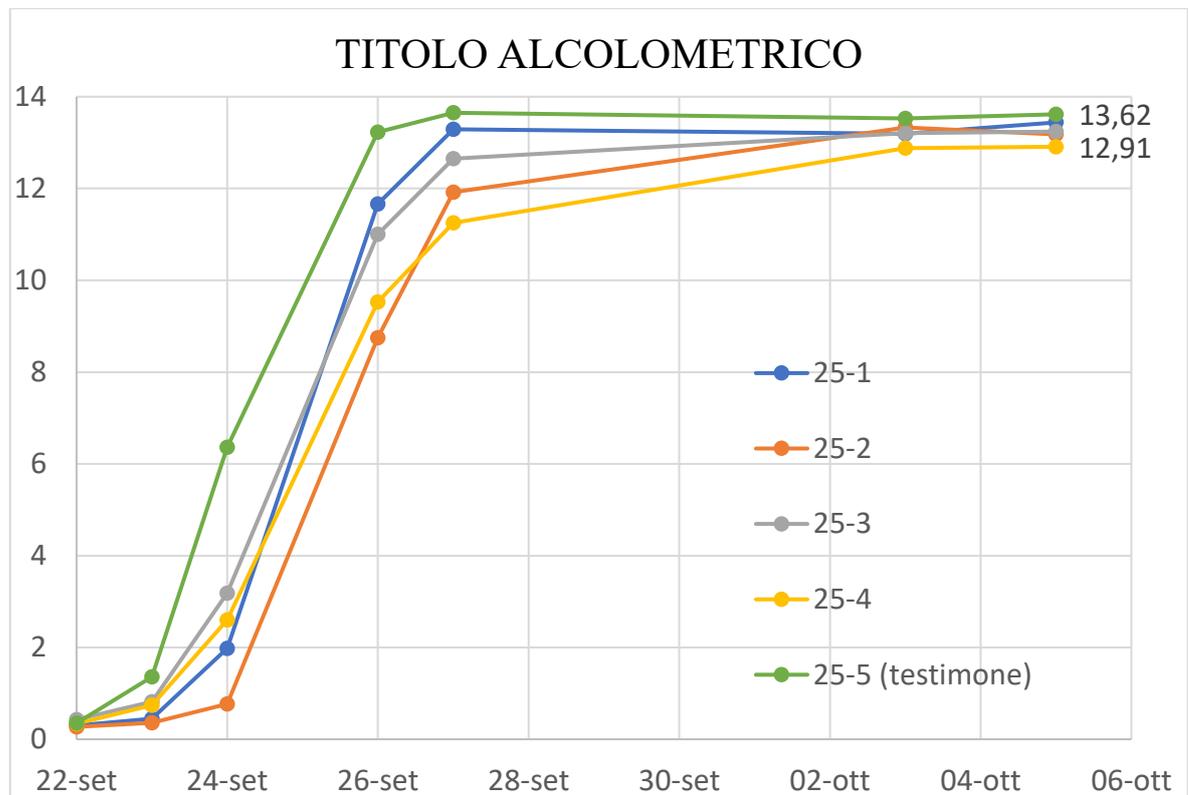


Figura 6: Andamento titolo alcolometrico per ogni modalità

4.2 TEMPERATURA

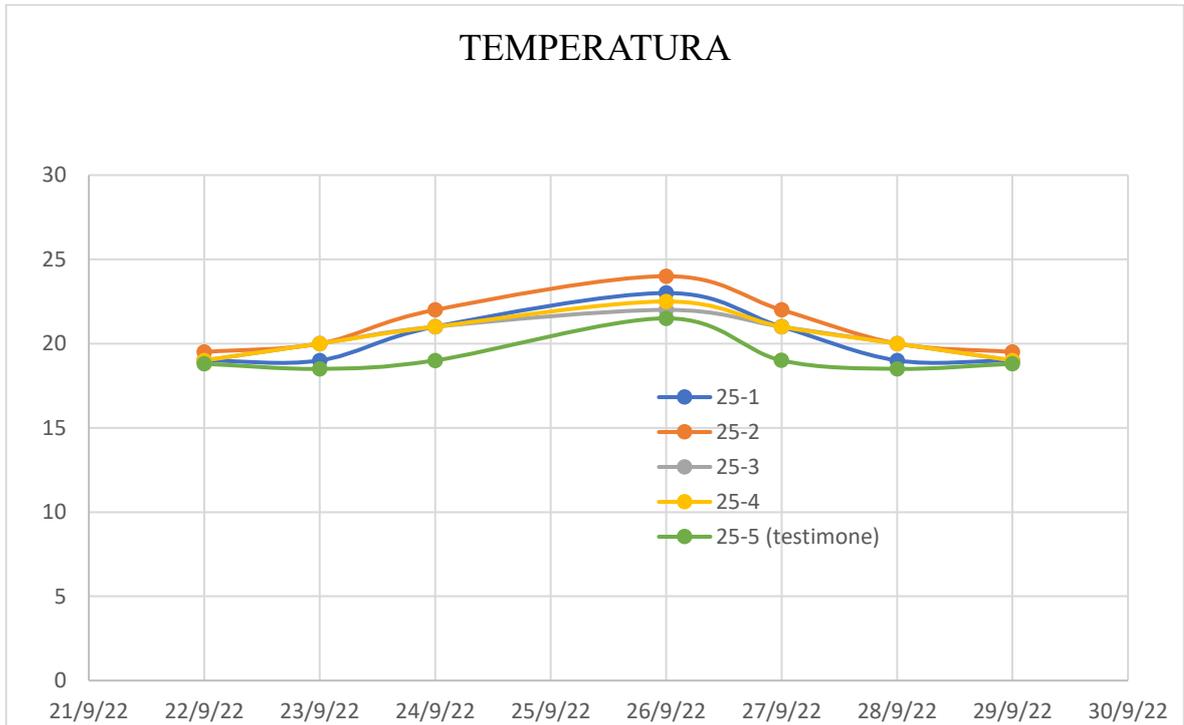


Figura 7: Andamento delle temperature per ogni modalità

La temperatura è stata misurata per tutto il periodo della fermentazione e come possiamo notare è simile per le modalità 25-1, 25-2, 25-3, 25-4 (21°C), invece è stata di poco inferiore durante il periodo centrale della fermentazione per la modalità 25-5 (19°C).

4.3 ACIDO LATTICO, ACIDO MALICO

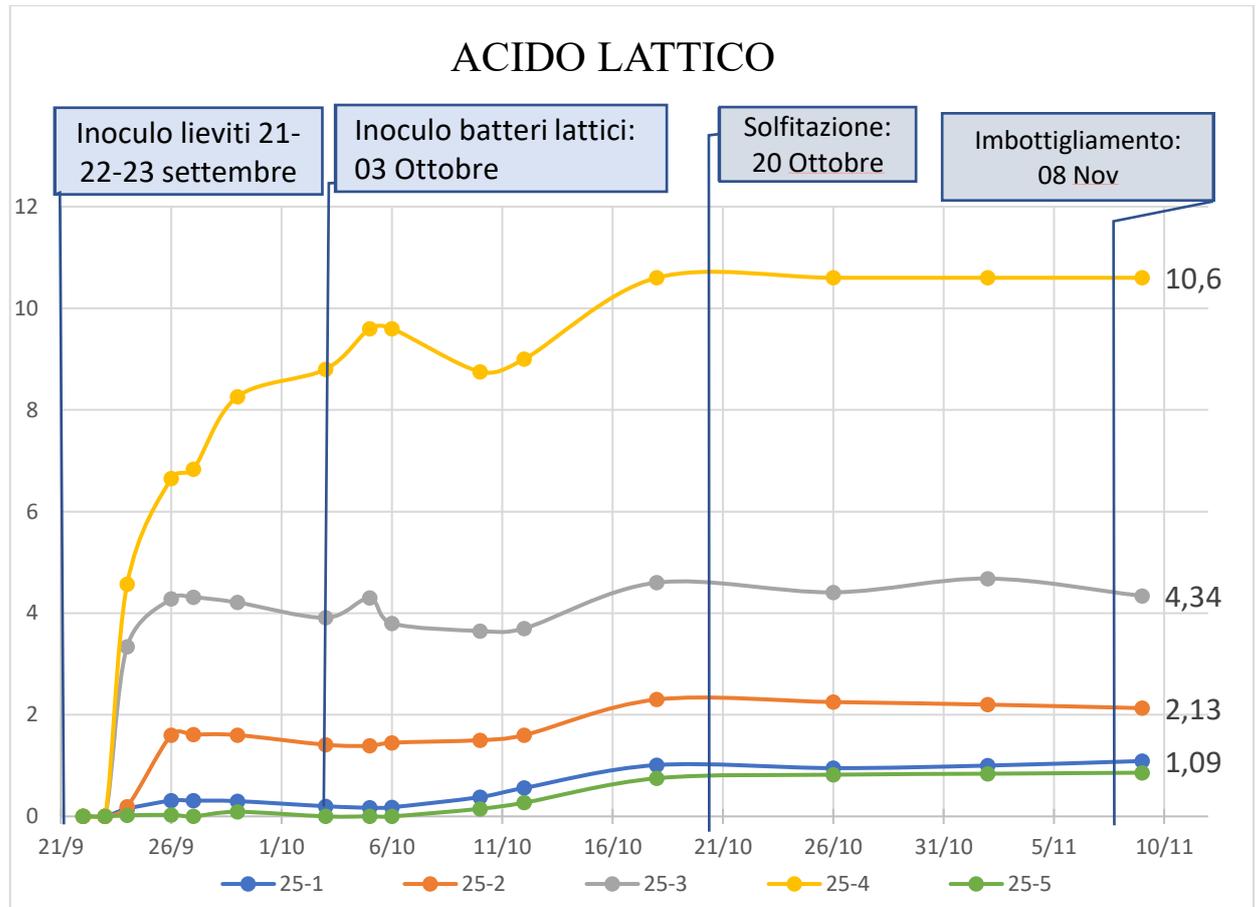


Figura 8: Andamento acido lattico per ogni modalità

Come atteso il lievito *Lachancea thermotolerans*, quindi modalità 25-1, 25-2, 25-3, 25-4, ha prodotto una sensibile quantità di acido lattico prima dell'inoculo dei batteri lattici, effettuato in data 3 ottobre.

Una notevole differenza di produzione dell'acido lattico si nota sia tra i ceppi di lievito sia per il momento dell'inoculo; infatti, sia il lievito 1 che il lievito 2 producono nella modalità 48h, una quantità di acido lattico superiore al doppio della stessa rispetto alla modalità 24h.

Nelle modalità 25-1, 25-2, 25-5, il tenore dell'acido lattico è aumentato ulteriormente con l'inoculo dei batteri lattici, nelle modalità 25-3 e 25-4 non vi è un ulteriore aumento in quanto, presumibilmente, la fermentazione malolattica è stata impedita da un pH sfavorevole.

La presenza costante di acido malico, per tutta la durata del processo di vinificazione, nelle modalità 25-3 e 25-4, è un'ulteriore conferma del mancato avvio della fermentazione malolattica.

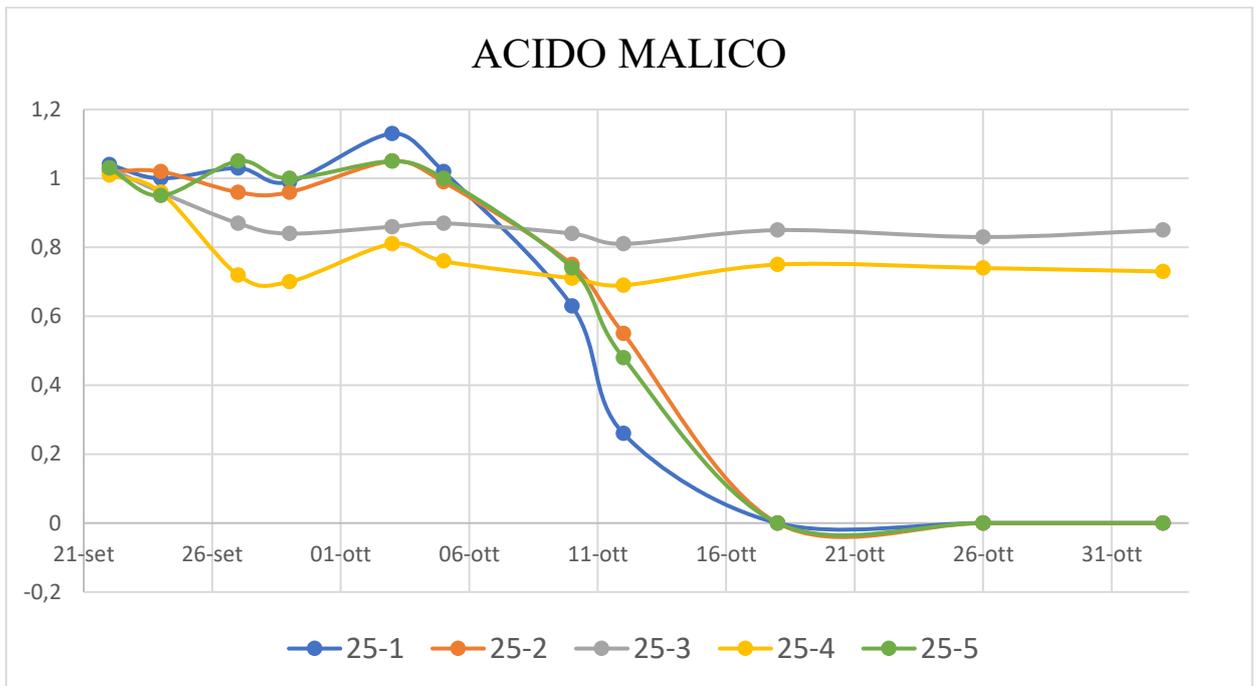


Figura 9: Variazione acido malico per ogni modalità

4.4 pH

Parallelamente alla produzione dell'acido lattico si verifica un abbassamento del pH, quindi le modalità, 25-3 e 25-4, che hanno prodotto una concentrazione maggiore di acido lattico, hanno mostrato effettivamente un pH inferiore.

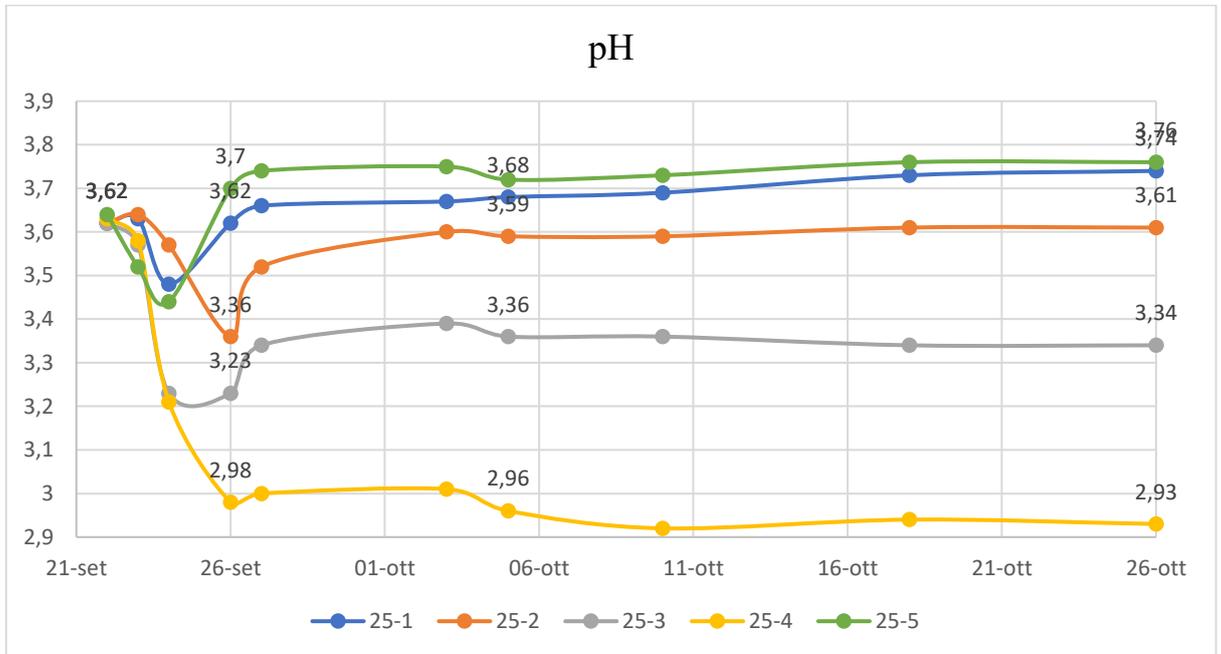


Figura 10: Variazione pH per ogni modalità

4.5 COMPOSTI VOLATILI

Dalle analisi dei composti volatili effettuati dalla società Nyseos, con sede a Montpellier, il dato che più si nota è la presenza di “etil lattato” (2-hydroxypropanoato d'ethyle) presente maggiormente nelle modalità 25-3 e 25-4 (lievito 2), indicatore dell'attività lattica di *Lachancea thermotolerans* e/o di *Oenococcus oeni*. Infatti, l'etil lattato è una molecola che si forma dall'esterificazione dell'etanolo con l'acido lattico, di conseguenza la sua presenza dovrebbe aumentare all'aumentare della concentrazione di acido lattico nel mezzo.

Le analisi degli aromi, per questione di costi analitici, sono state eseguite in singolo, quindi non è possibile stabilire se le differenze riscontrate tra i campioni sono effettivamente significative dal punto di vista statistico. In ogni caso, è possibile osservare una minore produzione di aromi quali “isoamil acetato” (sentore di banana), decanoato d'etile (floreale), ottanoato d'etile (ananas, pera), esanoato d'etile (mela, banana, viola) e butanoato d'etile (floreale, fruttato), nella fermentazione 24-4 dove è stato evidentemente più accentuato l'effetto di *Lachancea* e la produzione di acido lattico.

Modalità	2-phényléthanol		Esters d'acétate				Esters d'ethyle linéaire				Esters d'ethyle ramifiés						
	2PHEN (µg/L)	2PEN NUO	acétate d' hexyle HEAC (µg/L)	acétate d' isoamyle IAAC (µg/L)	acétate de 2-phényléthyle 2PHENAC (µg/L)	EA NUO	décanoate déthyle ETDEC (µg/L)	hexanoate déthyle ETHEX (µg/L)	octanoate d' éthyle ETOCT (µg/L)	butanoate d' éthyle ETBU (µg/L)	EEL NUO	2-hydroxypropanoate d' éthyle 2HPE (µg/L)	3-hydroxybutanoate d' éthyle 3HBE (µg/L)	2-méthylbutanoate d' éthyle 2MBE (µg/L)	2-méthylpropanoate d' éthyle 2MPE (µg/L)	2-hydroxyisocaproate d' éthyle 2HICE (µg/L)	EER NUO
25-1	71862	7	0	1916	217	65	148	434	459	218	43	14794	357	1	0	21	0
25-2	80097	8	0	1756	218	59	139	375	408	190	38	33290	305	2	0	20	0
25-3	75917	8	0	1495	149	50	120	311	352	189	34	103376	207	4	0	22	1
25-4	66557	7	0	1356	128	46	104	240	235	131	24	283243	100	3	0	19	2
25-5	67722	7	0	1531	232	52	129	338	366	163	34	46665	309	2	0	18	0

Figura 11: Contenuto di fenil etanolo, esteri acetati, esterei d'etile lineari ed esteri d'etile ramificati per ogni modalità. NUO (numero di unità olfattometrica)

Non sono state riscontrate differenze tra le varie modalità, invece, nella produzione di norisoprenoidi, terpenoli e alcoli superiori.

	C13-norisoprenoïdes					Terpénols			alcools supérieurs					
Nom	1,1,6-triméthyl-1,2-dihydronaphthalène					Linalol	Citronello	alpha terpineol	Terpenols	propanol	isobutanol	butanol	somme 2-methyl butanol et 3-methyl butanol	Total AI Sup
	TDN	AION	BDAM	BION	C13									
	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	NUO	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	NUO	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	
25-1	nd	nd	3,13	0,12	33	6,7	5,0	0,6	0	36428	72812	1095	272968	383
25-2	nd	nd	3,15	0,15	33	7,0	5,0	0,4	1	31736	62918	1290	259092	355
25-3	nd	nd	3,13	0,11	33	7,2	4,4	0,7	1	38840	61844	1640	264303	367
25-4	nd	nd	3,03	0,20	32	7,8	4,5	1,0	1	39624	59492	1694	237350	338
25-5	nd	nd	3,08	0,13	32	7,3	4,9	0,4	1	31254	66394	1079	240866	340

Figura 12: Contenuto di C13-norisoprenoidi, terpenoli e alcoli superiori per ogni modalità. NUO (numero di unità olfattometrica)

4.6 RIBOFLAVINA

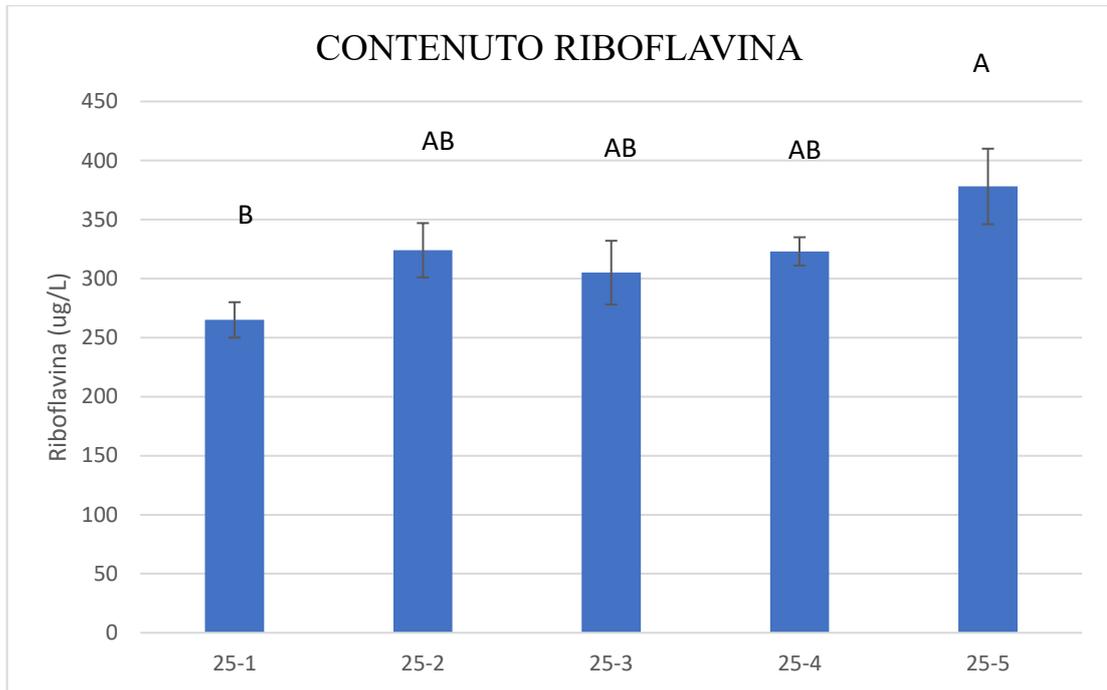


Figura 13: Contenuto di riboflavina analizzato per ogni modalità

Con l'analisi effettuata sul contenuto di riboflavina presente nei mosti a fine fermentazione, si è notato innanzitutto come esso fosse generalmente più alto del normale (concentrazione media a fine fermentazione 110 – 250 $\mu\text{g/L}$), questo è probabilmente dovuto proprio alla produzione con la tecnica della termovinificazione, che permette di estrarre maggiormente la riboflavina dai tessuti dell'uva. È possibile osservare, anche, che in tutte le modalità in cui è stato inoculato *Lachancea thermotolerans* in sequenza con *Saccharomyces cerevisiae*, il contenuto della vitamina era inferiore rispetto alla modalità testimone. È noto che oltre al contenuto di partenza dell'uva, la maggior fonte di riboflavina nel vino è la produzione da parte del lievito. Finora non è stato mai indagato il rilascio di riboflavina da parte di lieviti non-*Saccharomyces*, in questo caso apparentemente la presenza di *Lachancea* ha avuto un effetto di riduzione della riboflavina, non è chiaro però se questo può essere un effetto diretto (metabolizzazione diretta della vitamina da parte di *Lachancea*) o indiretto, andando a modificare il metabolismo della riboflavina in

Saccharomyces cerevisiae. È interessante notare, però, che con entrambi i ceppi la riduzione di riboflavina è stata maggiore nelle modalità in cui il *Saccharomyces cerevisiae* è stato inoculato 24h, questo farebbe escludere un meccanismo di metabolizzazione diretta della riboflavina.

CAPITOLO 5: CONCLUSIONI

Con il presente studio è stato possibile evidenziare che il lievito *Lachancea thermotolerans* permette di ottenere anche su vini rossi ricchi di polifenoli (come nel caso di un mosto termovinificato) un'elevata concentrazione di acido lattico e un ridotto titolo alcolometrico, caratteristiche che conferiscono al prodotto finale una maggiore freschezza, rendendolo più rispondente alle richieste del mercato. Inoltre, è stato possibile osservare come vini ottenuti da un inoculo sequenziale abbiano un contenuto di riboflavina minore rispetto al testimone fermentato solo con lievito *Saccharomyces cerevisiae*.

La riboflavina non costituisce un problema per i vini rossi, ma se fosse confermato anche su vini bianchi, questo risultato suggerisce che l'utilizzo di *Lachancea* potrebbe anche essere pensato per ridurre in maniera naturale la predisposizione di un vino a difetti organolettici come il gusto di luce.

Per quanto riguarda il profilo aromatico non si sono notati risultati sensibilmente diversi tra il testimone e le modalità con fermentazione sequenziale, nonostante per queste ultime ci si aspettasse un profilo aromatico più complesso.

La sperimentazione rivela che *Lachancea thermotolerans* potrebbe costituire una valida alternativa all'utilizzo di prodotti chimici per l'acidificazione dei vini, soprattutto se si vuole intraprendere una scelta sostenibile in termini di rispetto dell'ambiente e di salvaguardia della biodiversità.

In conclusione, si ritiene necessario condurre ulteriori studi prendendo in considerazione altre varietà di uve e volumi maggiori, in modo da avere un quadro più completo su un suo migliore utilizzo.

BIBLIOGRAFIA

1. **Cletus P. Kurtzman.** *Phylogenetic circumscription of Saccharomyces, Kluyveromyces and other members of the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera Lachancea, Nakaseomyces, Naumovia, Vanderwaltozyma and Zygorhizula.* 2003. Vol. 4.
2. **Banilas G, Sgouros G, Nisiotou A.** *Development of microsatellite markers for Lachancea thermotolerans.* s.l. : Microbiological Research, dicembre 2016.
3. **Witte V, Krohn U, Emeis CC.** *Characterization of yeasts with high L[+]-lactic acid production: lactic acid specific soft-agar overlay (LASSO) and TAFE-patterns.* s.l. : J Basic Microbiol, 1989.
4. **Michael Sauer, Danilo Porro, Diethard Mattanovic, Paola Branduardi.** *16 years research on lactic acid production with yeast - ready for the market?* s.l. : Professor Stephen Harding, 2010. Vol. 27.
5. **Neil P. Jolly, Cristian Varela, Isak S. Pretorius.** *Not your ordinary yeast: non-Saccharomyces yeasts in wine production uncovered.* Sydney : Jens Nielsen, 11 Novembre 2013.
6. **F. Comitini.** *Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with Saccharomyces cerevisiae.* 2011.
7. **Schnierda, T.** *Optimization of carbon and nitrogen medium components for biomass production using non-Saccharomyces wine yeasts.* 2013.
8. **K. Kapsopoulou, A. Kapaklis and H. Spyropoulos.** *Growth and fermentation characteristics of a strain of the wine yeast Kluyveromyces thermotolerans isolated in Greece.* 2005.
9. **H. Fleet, Graham.** *Yeast interactions and wine flavour.* 2003.
10. **Aponte, M.** *Potential role of yeast strains isolated from grapes in the production of Taurasi DOCG.* 2016.
11. *An Integrative View of the Role of Lachancea thermotolerans in Wine Technology.* **Vicente, Javier.** 2021.
12. *Oenological traits of Lachancea thermotolerans show signs of domestication and allopatric differentiation.* **Ana Hranilovic, Joanna M. Gambetta, Leigh Schmidtke, Paul K. Boss, Paul R. Grbin, Isabelle Masneuf-Pomarede, Marina Bely.**
13. **Chambers, Paul.** *Microbiology Australia .* 2007. p. 43. Vol. 28.
14. **Olmo, Purificación Carrasco · Amparo Querol · Marcel·lí del.** *Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains.* 2001.
15. **Gayon, P. Ribéreau -.** *The Anthocyanins of Grapes and Wines.* 1982. Vol. Chapter 8.
16. **P. Ribéreau-Gayon.** *Traité d'oenologie 2. Chimie du vin - Stabilisation et traitements.* 2018.
17. **Gayon, P. Ribéreau -.** *Traité d'oenologie, 1 .* 2020.
18. *Glycerol in Australian Wines and Factors Influencing Its Formation.* **B. C. Rankine, D. Annette Bridson.** 1971.

19. *SSUI mediates sulphite efflux in Saccharomyces cerevisiae*. **Hoon Park, Alan T. Bakalinsky**.
20. *Comprehensive study of the dynamic interaction between SO₂ and acetaldehyde during alcoholic fermentation*. **Thomas Ochando, Jean-Roch Mouret, Anne Humbert-Goffard, Evelyne Aguera, Jean-Marie Sablayrolles, Vincent Farines**.
21. **Waterhouse, A.L, Sacks, G.L, Jeffery, D.W.** *Understandig Wine Chemistry* . 2016.
22. **P.F.Heelis**. *The photophysical and photochemica properties of flavins*. 1982.
23. **Ournac, A.** *Annales de Technologie Agricole*. 1968.
24. **ALICE P. HALL, LISA BRINNER, MAYNARD A. AMERINE, AGNES FAY MORGAN.** *THE B VITAMIN CONTENT OF GRAPES, MUSTS, AND WINES*. 1956.
25. **Ismail, A.A., Ali, A.M.M.** *Selection of high ethanol-yielding Saccharomyces*. 1971.
26. **M. GHAREIB, K.A. YOUSSEF and A.A. KHALIL.** *Ethanol Tolerance of Saccharomyces cerevisiae and Its Relationship to Lipid Content and Composition*. 1987.
27. **Heinzel, M.A., Trüper, H.G.** *Sulfite formation by wine yeasts*. 1978. p. 243–247.
28. **M.Werner, D. Rauhut, P.Cottureau.** *Yeast and natural production of sulphites*. 2009.
29. **Daniela Fracassetti, Sara Limbo, Luisa Pellegrino, Antonio Tirelli.** **dioxide, Light-induced reactions of methionine and riboflavin in model wine: Effects of hydrolysable tannins and sulfur**. 2019.

RINGRAZIAMENTI

Non posso non ringraziare la mia famiglia che mi ha sostenuto nel mio percorso educativo e che mi ha trasmesso la passione per il mondo del vino. Un grazie speciale a Gloria, la persona che più di tutte è stata capace di capirmi e di sostenermi nei momenti difficili.

Inoltre, ringrazio il mio relatore, il professor Simone Vincenzi per avermi offerto la possibilità di svolgere il tirocinio presso Sofralab grazie al quale ho potuto sviluppare la mia tesi. I suoi preziosi consigli e la sua disponibilità sono stati fondamentali per la stesura dell'elaborato da lui seguita in maniera scrupolosa e accurata

Je tiens à remercier chaleureusement Olivier Fonade qui a suivi pas à pas mes recherches. Sa gentillesse et son professionnalisme ont augmenté mon intérêt et mes connaissances. Je le remercie également pour la patience qui a eu envers mes difficultés linguistiques, que j'ai surmontées lors du stage.

Un ringraziamento speciale va ai miei colleghi e amici per aver condiviso esperienze universitarie e vita quotidiana.